

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Optical system for incident light illumination fluorescence microscopy - splits light from source into several beams for independent modification before recombination

Patent Number: DE4221063

Publication date: 1994-01-05

5 Inventor(s): HEIDEN THOMAS DR (SE); TRIBUKAIT BERNHARD (SE)

Applicant(s): HEIDEN THOMAS DR (SE); TRIBUKAIT BERNHARD (SE)

Requested Patent: DE4221063

Application Number: DE19924221063 19920626

Priority Number(s): DE19924221063 19920626

10 IPC Classification: G02B21/06

EC Classification: G02B21/08B, G02B21/16, G02B21/18, G02B21/36

Equivalents:

---

15 Abstract

---

20 The radiation beams are formed from a single light source (1) and the beams have different wavelengths. A light source is provided with a wide spectral energy-spectrum or with different distinct wavelengths. Also conventional optical components such as a condenser lens system (2), lenses, dichroic beam dividers and optical filters are arranged so that independent radiation beams are formed.

25 The independent radiation beams are separately modified and then are passed into each other. The light beam thus formed consists of different wavelengths. A dichroic double mirror (10) or a rejection band filter is provided, which transmits with higher efficiency, as well as reflecting the different excitation beams besides the fluorescence colours.

30 USE/ADVANTAGE - For detecting characteristics eg of biological cell esp. for observing fluorescence characteristics of DNA, RNA etc. Simple optical system facilitates quantitative measurement of fluorescent light of different wavelengths of different colouring, with min. effects of chromatic aberrations in excitation light path.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 42 21 063 C 2

⑯ Int. Cl. 5:  
G 02 B 21/06  
G 01 N 21/64

DE 42 21 063 C 2

⑯ Aktenzeichen: P 42 21 063.1-42  
⑯ Anmeldetag: 26. 6. 92  
⑯ Offenlegungstag: 5. 1. 94  
⑯ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 1. 6. 94

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Heiden, Thomas, Dr., Stockholm, SE; Tribukait,  
Bernhard, Dr., Drottningholm, SE

⑯ Vertreter:

Ritter von Raffay, V., Dipl.-Ing.; Fleck, T.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 20249  
Hamburg

⑯ Erfinder:

gleich Patentinhaber

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 28 18 841 C2  
DE 39 15 421 A1  
US 42 25 229

Double beam application in flow techniques and  
recent results, M. Stöhr in Pulse-Cytophotometry,  
1976, p. 39-35;

⑯ Optisches System für Auflicht-Fluoreszenzmikroskop zur Beobachtung mehrerer Fluoreszenzvorgänge

DE 42 21 063 C 2

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

Ein derartiges Auflicht-Fluoreszenzmikroskop ist aus der DE 39 15 421 A1 bekannt. Bei diesem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop erzeugt ein erster und ein zweiter dichroitischer Strahlteiler aus einem Anregungslichtbündel zwei Teillichtbündel mit unterschiedlicher Wellenlänge. Diese Teillichtbündel werden über eine Lochscheibe abwechselnd einem dritten dichroitischen Strahlteiler zugeführt und von diesem zu einem Gesamtlichtbündel vereinigt, wobei eine Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe auch einen Austausch der dichroitischen Strahlteiler und der zugehörigen Monochromatisierungsfilter erfordert. Dieses bekannte Auflicht-Fluoreszenzmikroskop ermöglicht keine Aufteilung des Anregungslichtbündels in Teillichtbündel und deren separate, wellenlängen-spezifische Korrektur mit anschließender Vereinigung zu einem Gesamtlichtbündel.

Aus der DE 28 18 841 C2 ist ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bekannt, bei dem ein erster dichroitischer Strahlteiler das Anregungslichtbündel auf die zu untersuchenden Zellen reflektiert und das emitierte Fluoreszenzlicht passieren läßt, das dann von einem weiteren dichroitischen Strahlteiler in einen für den Zellkern und einen für das Zytoplasma charakteristischen Anteil aufgespalten wird, aus deren Verhältnis auf das Vorliegen einer Krebszelle geschlossen wird.

Die Beobachtung und Messung von Lumineszenz (z. B. Fluoreszenz) ist eine Möglichkeit, die Eigenschaften von biologischen Zellen zu untersuchen. Solche Analysen können gemacht werden, indem die Zellen mit unterschiedlichen chemischen Substanzen behandelt und mit Licht bestrahlt werden. Zellen können mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden, die Fluoreszenzlicht ausstrahlen, das spezifisch ist für Zellinhaltsstoffe wie z. B. DNA, RNA, Gesamtprotein oder bestimmte Proteine, die mit monoklonalen Antikörpern markiert sind.

Farbstoffe für solche Analysen zeigen Absorptionsmaxima bei bestimmten Wellenlängen. In Systemen vor der hier beschriebenen Erfindung werden für die Beobachtung und Analyse von Zellen, die mit zwei oder mehr als zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen mit Absorptionsmaximal in weit voneinander entfernt liegenden Spektralbereichen gefärbt sind, vollständige Sätze von optischen Komponenten ausgetauscht, die aus Anregungsfilters, einem Sperrfilter, und einem dichroitischen Farbteiler bestehen. Solch ein Filter und Spiegel-Satz, dessen spektrale Charakteristik zu den Absorptions- und Fluoreszenzemissionseigenschaften von einem Farbstoff paßt, wird durch einen anderen Filter und Spiegel-Satz ersetzt, der zu den Eigenschaften eines anderen Farbstoffs paßt und so weiter.

Kürzlich hat die Firma Zeiss einen Doppelfiltersatz eingeführt, der es ermöglicht, mit Hilfe einer einzelnen Lampe als Lichtquellen die Fluoreszenz von zwei unterschiedlichen Fluorochromen zu beobachten, die in unterschiedlichen Spektralregionen absorbieren. Diese Regionen, die eine liegt bei 490 nm, die andere bei etwa 550 nm, sind nicht weit voneinander entfernt. Die Effekte von chromatischen Aberrationen im Anregungslichtweg sind also nur gering. Das Prinzip dieses Systems berücksichtigt und korrigiert nicht chromatische Fehler, die sich nachteilig auswirken können, wenn Anregungslichtwellenlängen aus weit voneinander entfernt liegen-

den Spektralbereichen gewählt werden. In Mikroskopen, die solche optischen Komponenten verwenden, ist eine exakte quantitative Fluoreszenz-Analyse nicht möglich, wenn die Emissionsspektren der Farbstoffe überlappen oder wenn Energietransfer von einem Fluorochrom zum anderen vorkommt.

Für die ausschließlich quantitative Analyse von Fluoreszenz in Zellen, die mit zwei oder mehr als zwei Fluorochromen gefärbt sind, existieren Durchflußcytometer-Systeme, die in zwei oder drei getrennten Bereichen in der Objektebene die Fluoreszenzen mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen anregen. Solche Systeme werden beschrieben von M. Stöhr in "Double Beam Application in Flow Technique and recent Results", Pulse-Cytophotometry, 1976, 39—145, und von W. Göhde (US 4 225 229). In diesen Systemen fließt jede Zelle, die analysiert wird, der Reihe nach durch diese Bereiche und strahlt Fluoreszenzlicht aus, das quantitativ gemessen wird. Die Morphologie von Zellen oder die Architektur von ganzen, intakten Geweben kann jedoch nicht in solchen Systemen betrachtet oder analysiert werden.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop der eingangs genannten Art für quantitative Meßzwecke zur Verfügung zu stellen, das eine von einer chromatischen Aberration ungestörte Anregung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe auch dann ermöglicht, wenn sich diese in ihren Anregungswellenlängen erheblich unterscheiden.

Diese Aufgabe wird durch das Kennzeichen des Anspruches 1 gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 6.

Die Strahlbündel werden unabhängig voneinander verändert, indem mit Hilfe von Farbglas- oder Interferenzfiltern spezifische, unterschiedliche Wellenlängen herausgefiltert werden. Die Durchmesser der Strahlbündel werden reduziert und dem Durchmesser der Eintrittspupille des Objektives angepaßt. Diese Verkleinerung der Strahlbündeldurchmesser wird unabhängig für jedes Strahlbündel mit Hilfe von zwei Linsen erreicht. Die Positionen der Linsen werden so gewählt, daß chromatische Aberrationen, die durch alle Linsen des Anregungslichtweges eingeführt werden können, für die entsprechenden Wellenlängen der Strahlbündel minimiert werden. Auf diese Weise kann das Köhlersche Beleuchtungsprinzip für die unterschiedlichen Strahlbündel verwirklicht werden, auch wenn das verwendete Mikroskop-Objektiv nicht für Farbfehler in den Spektralbereichen von Interesse korrigiert ist. Das heißt, daß die Lichtquelle für jedes einzelne Strahlbündel in der Eintrittspupille des Objektives abgebildet werden kann. Die Position der Eintrittspupille kann für unterschiedliche Wellenlängen verschieden sein, abhängig von der Farbkorrektur des Objektives für diese Wellenlänge.

Die genannten unabhängigen Strahlbündel werden, nachdem sie die Linsenpaare passiert haben, mit Hilfe von Vollspiegeln und einem dichroitischen Spiegel ineinander überführt. Sie passieren eine weitere Linse und werden dann von einem dichroitischen Mehrfachspiegel, der durch zwei oder mehr Reflexions- und Transmissionssbänder charakterisiert ist, fast vollständig reflektiert. Das reflektierte Licht, das aus unterschiedlichen Wellenlängen besteht, tritt in das Mikroskop-Objektiv ein und beleuchtet die Objektregion homogen entsprechend dem Köhlerschen Prinzip.

Anstelle von Bogenlampen können auch Laser mit Linien unterschiedlicher Wellenlänge verwendet wer-

den.

Das Fluoreszenzlicht von Zellen, die mit zwei oder mehr als zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sind, welche durch die gewählten Wellenlängen der Anregungsstrahlenbündel angeregt werden, glangt in das Mikroskop-Objektiv, passiert das Objektiv und passiert dann den genannten dichroitischen Mehrfachspiegel, der eine hohe Transmission in den Spektralbereichen des Fluoreszenzlichtes hat. Ein zusätzlicher dichroitischer Spiegel desselben Typs wird als Sperrfilter verwendet, um Hintergrundlicht zu schwächen. Ein Bild des Objekts wird in der Ebene der Meßfeldblende im Emissionslichtstrahlengang gebildet. Falls es keine konventionellen Mikroskop-Objektive mit Linsensystemen gibt, die in den Spektralbereichen des Fluoreszenzlichtes der verwendeten Fluoreszenz für chromatische Fehler korrigiert sind, wird die Verwendung von Spiegelobjektiven, die frei von chromatischen Aberrationen sind, vorgeschlagen. Das Fluoreszenzlicht passiert einen zweiten Sperrfilter, tritt in das Mikroskop-Okular ein und das Objekt kann mit dem Auge betrachtet werden oder quantitativ mit Hilfe von elektronischen Vorrichtungen wie CCD-Kameras analysiert werden.

Mit diesem relativ einfachen optischen System, das mehrere Wellenlängen von einer einzelnen Lichtquelle ausnutzt, ist es möglich, mehrere Fluoreszenzen, auch aus weit voneinander entfernt liegenden Spektralbereichen, von statischen Objekten wie biologischen Zellen zu analysieren. Diese Analysen können gleichzeitig gemacht werden; das System ist also beträchtlich schneller als Mikroskope, die austauschbare Filterblocks verwenden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beschreibung in Verbindung mit den gezeigten Abbildungen näher erläutert.

Es zeigt

Abb. 1 eine schematische Skizze des optischen Systems nach einem Ausführungsbeispiel;

Abb. 2 ein Transmissionsspektrum des verwendeten Doppelspiegels;

Abb. 3 eine Modifikation des beschriebenen, optischen Systems mit einem rotierenden Blendenrad;

Abb. 4 eine der Abb. 1 entsprechende schematische Darstellung, jedoch einer anderen Ausführungsform;

Abb. 5a und 5b weitere Modifikationen des optischen Systems; und

Abb. 6 eine schematische Darstellung einer Anwendungsmöglichkeit des beschriebenen optischen Systems in Verbindung mit einer Nipkow-Scheibe.

Abb. 1 zeigt eine schematische Skizze des optischen Systems gemäß der hier beschriebenen Erfindung. Der rechte Teil zeigt das ganze optische System, während der linke Teil nur die Emissionslicht-Optik darstellt. Als ein Beispiel wird die Anregungslichtoptik für ultraviolettes und grünes Licht einer Quecksilberdampflampe gezeigt. Die Bezeichnungen der speziellen Komponenten, die nur in diesem Beispiel verwendet werden, sind in Klammern gesetzt. Das in der Abb. 1 gezeigte optische System hat eine Lichtquelle 1 (z. B. eine Quecksilberdampflampe HBO 100). Der Kollimator 2 sammelt einen Teil des Lichts, das von der Lichtquelle ausgestrahlt wird, und bündelt es zu einem annähernd parallelen Lichtstrahlenbündel. Das Licht passiert dann Wärmeschutzfilter 3 (Schott Filter KG1 und BG38) und wird dann in zwei Strahlenbündel aufgeteilt mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels 10a (dichroitischer Spiegel mit Kante bei 420 nm), der mit einem Winkel von 45 Grad zur optischen Achse des Mikroskop-Objektives geneigt

ist. zwei Strahlenbündel mit Licht aus zwei unterschiedlichen Spektralregionen der Lichtquelle werden also gebildet.

Diese Strahlenbündel werden unabhängig voneinander verändert, zuerst, indem annähernd monochromatisches Licht unterschiedlicher Wellenlängen mit Hilfe von optischen Filtern 4a (Schott Filter UG1) und 4b (Bandpaßfilter F546) herausgefiltert wird. Dann werden die Lichtbündeldurchmesser mit Hilfe von Linsenpaaren 5a, 7a; 5b, 7b verringert. Diese Veränderung kann für jedes der Strahlenbündel separat so gemacht werden, daß für jede Wellenlänge die Lichtquelle in die Eintrittspupille des Mikroskop-Objektives 13 abgebildet wird unter Berücksichtigung von Effekten von chromatischen Aberrationen der Linsen im Anregungslichtweg. Auf diese Art kann Köhlersche Beleuchtung für beide Wellenlängen erreicht werden.

Der abgelenkte Lichtstrahl wird von zwei Vollspiegeln 6 und 8 und dem konventionellen dichroitischen Spiegel 10b (Strahlenteiler mit Kante bei 420 nm) reflektiert. Die drei Spiegel sind mit einem Winkel von 45 Grad zur optischen Achse des Mikroskop-Objektives geneigt. Indem die Spiegel so angeordnet werden wie es in Abb. 1 gezeigt ist, werden die beiden Strahlenbündel ineinander überführt. Der Vollspiegel 8 ist in allen drei Richtungen justierbar, so daß durch eine Feineinstellung gewährleistet ist, daß die Strahlenbündel richtig ineinander überführt werden. Leuchtfeldblenden 9a, 9b können angewendet werden, um den ausgeleuchteten Bereich in der Objekt-Ebene zu begrenzen.

Die kombinierten Strahlenbündel passieren eine Linse 11 und werden dann fast vollständig von dem dichroitischen Mehrfachspiegel 12a (in diesem Beispiel ein Doppelspiegel mit Reflektionsbanden im ultravioletten und grünen Spektralbereich; Transmissionsspektrum des Spiegels siehe Abb. 2), der auch mit einem Winkel von 45 Grad zur Mikroskop-objektiv Achse geneigt ist, reflektiert. Das Licht passiert dann das Mikroskop-Objektiv 13, das ein Glycerin-Immersions-Objektiv mit hoher numerischer Apertur sein kann, passiert das Glycerin 14, das Deckglas 15 und beleuchtet dann eine biologische Zelle 16 in der Objektebene.

Ein Teil des Fluoreszenzlichts der Zelle, die mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen gefärbt ist, tritt in das Mikroskop-Objektiv ein, passiert das Objektiv und passiert zum großen Teil den dichroitischen Doppelspiegel 12a, der eine hohe Transmission in den Spektralbereichen der Fluoreszenzlichtfarben aufweist. Ein zweiter Spiegel desselben Typs 12b dient als Sperrfilter zur Schwächung von Hintergrundlicht. In der Ebene der Meßfeldblende 19a wird ein Bild der Zelle geformt. Diese Blende begrenzt den Teil des Objekt-Bildes, der betrachtet oder analysiert wird. Das Licht passiert dann einen zusätzlichen Sperrfilter 20a (Schott Filter GG 435). Das Fluoreszenzlichtbild kann durch ein Okular 22 betrachtet werden oder mit Hilfe von elektronischen Vorrichtungen wie z. B. CCD-Kameras analysiert werden.

Abb. 2 zeigt das Transmissionsspektrum eines kommerziell erhältlichen Doppelspiegels 12a, der in dem in Abbildung 1 beschriebenen optischen System verwendet werden kann, das als ein Beispiel die Auflicht-Fluoreszenz-Anregung mit ultraviolettem (365 nm) und grünem (546 nm) Licht einer Quecksilberdampflampe gemäß der hier dargestellten Erfindung beschreibt. Das Spektrum wurde bei einem Einfallsinkel von 45 Grad aufgezeichnet. Dieser Spiegel ist charakterisiert durch Reflektionsbanden im ultravioletten (365 nm) und grü-

nen (546 nm) Spektralbereich und durch eine hohe Transmission im blauen (400–500 nm) und roten (>600 nm) Spektralbereich. Dadurch wird eine starke Anregung mit ultraviolettem und grünem Licht und eine empfindliche Detektion von blauem und rotem Fluoreszenz-Licht ermöglicht.

Abb. 3 zeigt eine Modifikation des optischen Systems, das in der hier beschriebenen Erfindung dargestellt wird. Dieser Modifikation gemäß wird ein rotierendes Rad von Blenden 27 eingeführt, die als Verschluß jeweils ein paar von Anregungs- und Emissionslichtstrahlen blockieren, während das andere Paar frei passieren kann. Auf diese Art können die beiden Fluoreszenzfarbstoffe unabhängig voneinander und exakt gemessen werden. Nach Abb. 1, die als Beispiel die Beleuchtung von Zellen, die mit zwei Fluorochromen gefärbt sind, zeigt, wird ein und dieselbe Region des Objektes zur selben Zeit mit beiden Anregungslichtbündeln beleuchtet. Die beiden resultierenden Fluoreszenzfarben werden ebenfalls in der selben Region des Objektes und zur selben Zeit analysiert. Mit einem solchen optischen System (Abb. 1) ist eine exakte quantitative Analyse der beiden Fluoreszenzen nicht möglich, wenn Energieübertragung von einem Farbstoff zum anderen vorkommt oder wenn die Emissionsspektren überlappen. Auch wenn die Emissionsspektren nur gering überlappen, ist eine exakte quantitative Messung beider Fluoreszenzintensitäten nicht möglich, wenn das Fluoreszenzlicht des einen Farbstoffs sehr viel stärker ist als das des anderen Farbstoffs.

Wenn zwei Vollspiegel 28 und 30 und ein Strahlenteilerspiegel 29 (dichroitischer Spiegel mit Kante bei 500 nm), wie in Abb. 3 gezeigt, zusätzlich verwendet werden, werden zwei Paare von Strahlenbündeln gebildet, das eine besteht aus ultraviolettem Anregungslicht und blauem Fluoreszenzlicht und das andere aus grünem Anregungslicht und rotem Fluoreszenzlicht. Ein rotierendes Rad von Blenden 27, das abwechselnd jeweils nur für eines der beiden Paare von Strahlenbündel öffnet, kann dann mit hoher Frequenz zwischen der einen und der anderen Art von Exzitation und Fluoreszenzdetektion hin- und herschalten. Auf diese Art können beide Fluoreszenzen z. B. mit Hilfe von CCD-Kameras in einem statischen Objekt in derselben Objektregion aber unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeiten analysiert werden, wobei eine hohe Frequenz des Umschaltens gewählt werden kann. Dadurch wird es möglich, die Effekte von Energieübertragung und von Überlappungen der Emissionsspektren zu minimieren.

Abb. 4 zeigt eine mögliche Modifikation des optischen Systems der hier dargestellten Erfindung, die es ermöglicht, quantitative, durchflußzytometrische Fluoreszenz-Analysen von Zellen entsprechend dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Methode, auszuführen. Diese Methode macht es möglich, ebenso wie die "double beam"-Exzitationsmethode, die Fluoreszenzintensitäten von Zellen, die mit zwei Farbstoffen gefärbt sind, unabhängig voneinander quantitativ zu messen. Beide Systeme verwenden Beleuchtung mit zwei Exzitationslichtbündeln von unterschiedlicher Wellenlänge in zwei räumlich getrennten Bereichen der Objekt ebene, die beide von jeder zu analysierenden Zelle passiert werden.

Indem das optische System, das in der hier vorgestellten Erfindung beschrieben wird, in ein Durchflußzytometer eingebaut wird und indem es, wie in Abb. 4 gezeigt, mit Hilfe von zwei schlitzförmigen Leuchtfeldblenden 9c, 9d modifiziert wird, können zwei separate

Bereiche in der Durchflußkammer 17b des Durchflußzytometers mit zwei Strahlenbündeln von unterschiedlicher Wellenlänge beleuchtet werden. In dem in Abb. 4 gezeigten Beispiel wird ultraviolettes und grünes Licht einer Quecksilberdampflampe verwendet. Das blaue und rote Fluoreszenzlicht der Zellen, die mit zwei unterschiedlichen, mit ultraviolettem und grünem Licht anregbaren Fluorochromen gefärbt sind und die beide Exzitationsregionen durchfließen, passiert den dichroitischen Doppelspiegel 12a. Mit Hilfe eines Strahlenteilers 18 (dichroitischer Spiegel mit Kante bei 500 nm), der mit einem Winkel von 45 Grad zur optischen Achse des Mikroskop-Objektives installiert ist, können die Fluoreszenzintensitäten in den zwei Beleuchtungsbereichen mit zwei Fotovervielfächern 21a, 21b gemessen werden. Vor jedem der beiden Fotovervielfächern ist eine schlitzförmige Meßfeldblende 19a, 19c so angebracht, daß nur das rote Fluoreszenzlicht aus dem Grün-Anregungsbereich die eine Blende passiert und nur das blaue Fluoreszenzlicht aus dem UV-Anregungsbereich die andere Blende passiert. Die Sperrfilter 20a und 20b (ein Bandpaß-Filter 435–490 und ein Schott-Filter OG590) sind so wie in Abb. 4 gezeigt vor den Fotovervielfächern angebracht zur Schwächung von Hintergrundlicht und zur Selektion der zu analysierenden Fluoreszenzfarben.

Die Unterschiede und Vorteile dieser modifizierten Optik im Vergleich zu der Zwei-Wellenlängen-Optik sind, daß das hier vorgestellte optische System zwei Strahlenbündel erzeugt, die unabhängig voneinander zum Ausgleich von chromatischen Aberrationen modifiziert werden können, und daß es einen dichroitischen Doppelspiegel oder Rejektionsbandfilter verwendet, der mit hoher Effektivität sowohl beide Anregungslängen reflektiert als auch beide Fluoreszenzstrahlen transmittiert.

Die Abb. 5a und 5b zeigen eine andere mögliche Modifikation des optischen Systems der hier dargestellten Erfindung, eine zweite Lichtquelle, z. B. ein Argon-Ionen-Laser kann zusätzlich angebracht werden. Mit Hilfe von einem Vollspiegel 23 und den dichroitischen Spiegeln 24 (Strahlenteiler mit Kante bei 420 nm) und 25 (Strahlenteiler mit Kante bei 500 nm) können drei unabhängige Lichtstrahlen ineinander überführt werden. Die kombinierten Lichtstrahlen werden dann von einem kommerziell erhältlichen dichroitischen Mehrfachspiegel 26a reflektiert, dessen Transmissionsspektrum, das bei einem Einfallsinkel von 45 Grad aufgezeichnet wurde, in der Abb. 5b gezeigt wird.

Abb. 6 stellt eine mögliche Anwendung des optischen Systems der hier gezeigten Erfindung in einem konfokalen Mikroskop dar, das eine Nipkow-Scheibe 31, ein Spiegel-Objektiv 32 und eine CCD-Kamera verwendet. Das optische System ist so angeordnet, daß die Nipkow-Scheibe 31, die in der Ebene der Leuchtfeldblende und Meßfeldblende liegt und die Konfokalität für Beleuchtung und Abbildung erzeugt, mit den kombinierten Strahlenbündeln beleuchtet wird. Die Verwendung eines Spiegelobjektives 32, das frei von chromatischen Abberationen ist, garantiert Konfokalität für beide Anregungswellenlänge und beide Fluoreszenzfarben. Auch schwache Fluoreszenzen können dann mit Hilfe der CCD-Kamera detektiert werden.

#### Patentansprüche

1. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop zur Beobachtung mehrerer Fluoreszenzvorgänge, welche durch

unterschiedliche, in biologischen Zellen (16) eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen verursacht werden, mit einer multispektralen Lichtquelle (1) und einem zugehörigen Kollimator (2), und mit einem dem Kollimator (2) nachgeschalteten, ersten dichroitischen Strahlteiler (10a), welcher aus dem Anregungslichtbündel ein Teillichtbündel reflektierend auskoppelt und das Restlichtbündel durch einen Monochromatisierungsfilter (4b) hindurch zu einem zweiten dichroitischen Strahlteiler (10b) durchläßt, wobei das Teillichtbündel über einen weiteren Monochromatisierungsfilter (4a) und zwei Spiegel (6, 8) dem zweiten dichroitischen Strahlteiler (10b) zugeführt wird, welcher das monochromatisierte Teillichtbündel dem von dem ersten Monochromatisierungsfilter (4b) monochromatisierten Restlichtbündel reflektierend querschnittsgleich überlagert und das Überlagerungslichtbündel einem dritten dichroitischen Strahlteiler (12a) im Objektivstrahlengang zuführt, welcher das Überlagerungslichtbündel durch das Objektiv (13) hindurch auf die zu beobachtenden biologischen Zellen (16) reflektiert und das von diesen Zellen (16) abgegebene Fluoreszenzlicht zu dem Okular (22) durchläßt, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl im Strahlengang des monochromatisierten Teillichtbündels nach dem weiteren Monochromatisierungsfilter (4a) als auch im Strahlengang des monochromatisierten Restlichtbündels nach dem Monochromatisierungsfilter (4b) jeweils ein separates Linsensystem (5a, 7a; 5b, 7b) angebracht und dem zweiten dichroitischen Strahlteiler (10b) eine Sammellinse (11) nachgeschaltet ist, welche das Überlagerungslichtbündel über den dritten dichroitischen Strahlteiler (12a) der Objektivlinse (13) zuführt, wobei die Linsen des Linsensystems (5a, 7a) im Teillichtbündel hinsichtlich des Konvergenzwinkels des 40 Teillichtbündels derart positioniert sind, daß die Sammellinse (11) das Teillichtbündel in den für die Wellenlänge des Teillichtbündels maßgeblichen Fokuspunkt der Objektivlinse (13) abbildet, und wobei die Linsen des Linsensystems (5b, 7b) im 45 Restlichtbündel hinsichtlich des Konvergenzwinkels des Restlichtbündels derart positioniert sind, daß die Sammellinse (11) das Restlichtbündel in den für die Wellenlänge des Restlichtbündels maßgeblichen Fokuspunkt der Objektivlinse (13) abbildet, so daß die beiden Linsensysteme (5a, 7a; 5b, 7b) 50 jeweils auf ein monochromatisiertes Lichtbündel einwirken und somit keine chromatische Aberration verursachen und die Objektivlinse (13) sowohl für die Wellenlänge des Teillichtbündels als auch für die Wellenlänge des Restlichtbündels paralleles Anregungslicht zu dem Objekt hin abgibt.

2. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv (13) für die von den Fluoreszenzfarbstoffen abgegebenen Fluoreszenzwellenlängen hinsichtlich einer chromatischen Aberration korrigiert oder als Spiegelobjektiv ausgebildet ist.

3. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem dritten dichroitischen Strahlteiler (12a) und dem Okular (22) ein für die Fluoreszenzwellenlängen durchlässiger, vierter dichroitischer Strahlteiler

(12b) sowie zur Unterdrückung von Hintergrundlicht ein Sperrfilter (20a) angebracht ist.

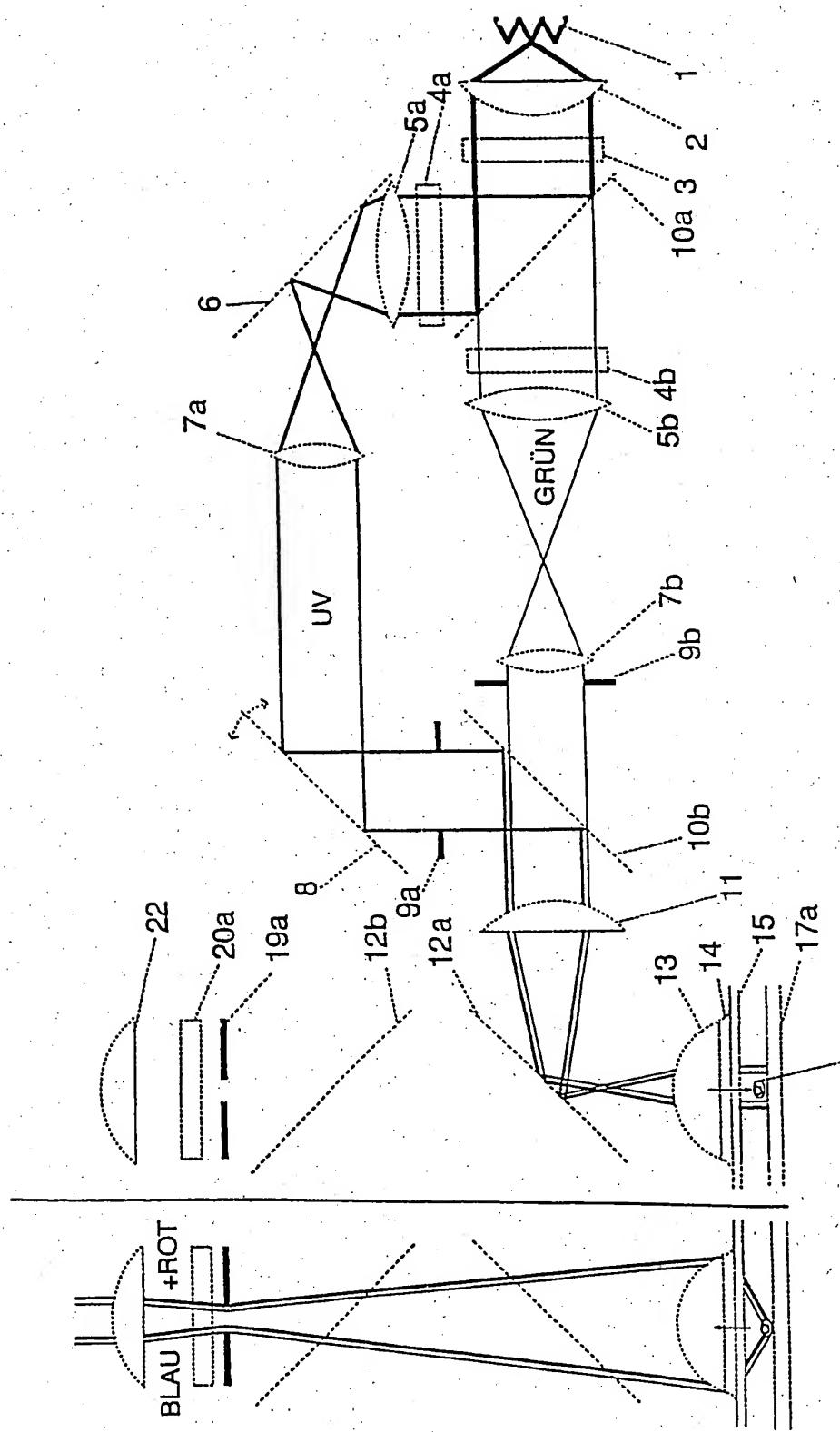
4. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem Okular (22) pro beobachteter Fluoreszenzwellenlänge eine CCD-Kamera nachgeschaltet ist und daß ein rotierendes Blendenrad (27) vorgesehen ist, welches alternativ das monochrome Teillichtbündel und gleichzeitig den Lichtweg zu der zugehörigen CCD-Kamera oder das monochromatisierte Restlichtbündel und gleichzeitig den Lichtweg zu dessen zugehöriger CCD-Kamera unterbricht, so daß immer nur eine Anregungswellenlänge und die zugehörige Fluoreszenzwellenlänge durchgelassen werden und dadurch Störeffekte infolge einer Überlappung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe oder einer Energieübertragung von einem Fluoreszenzfarbstoff auf einen anderen Fluoreszenzfarbstoff minimiert werden.

5. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer (8) der beiden Spiegel (6, 8) im Teillichtbündel zwischen dem dichroitischen Strahlteiler (10b) und dem Linsensystem (5a, 7a) angebracht und seinerseits als dichroitischer Strahlteiler (24) ausgebildet ist, durch den hindurch das monochromatisierte Licht einer zweiten Lichtquelle, deren Wellenlänge von den Wellenlängen des monochromatisierten Teillichtbündels und des monochromatisierten Restlichtbündels abweicht, einkoppelbar ist.

6. Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der multispektrale Lichtquelle (1) ein Wärmeschutzfilter (3) unmittelbar nachgeschaltet ist.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

**- Leerseite -**



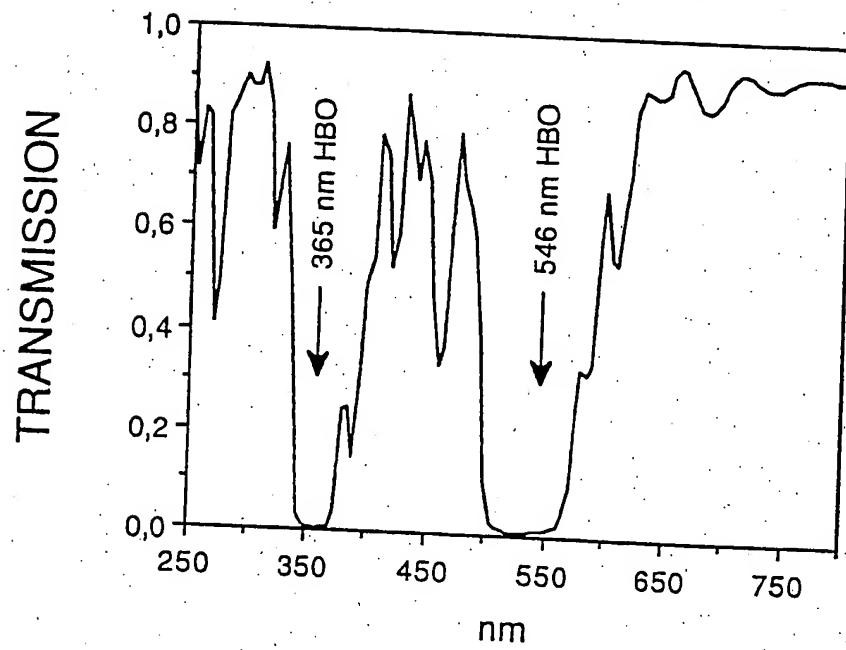


Abb.2

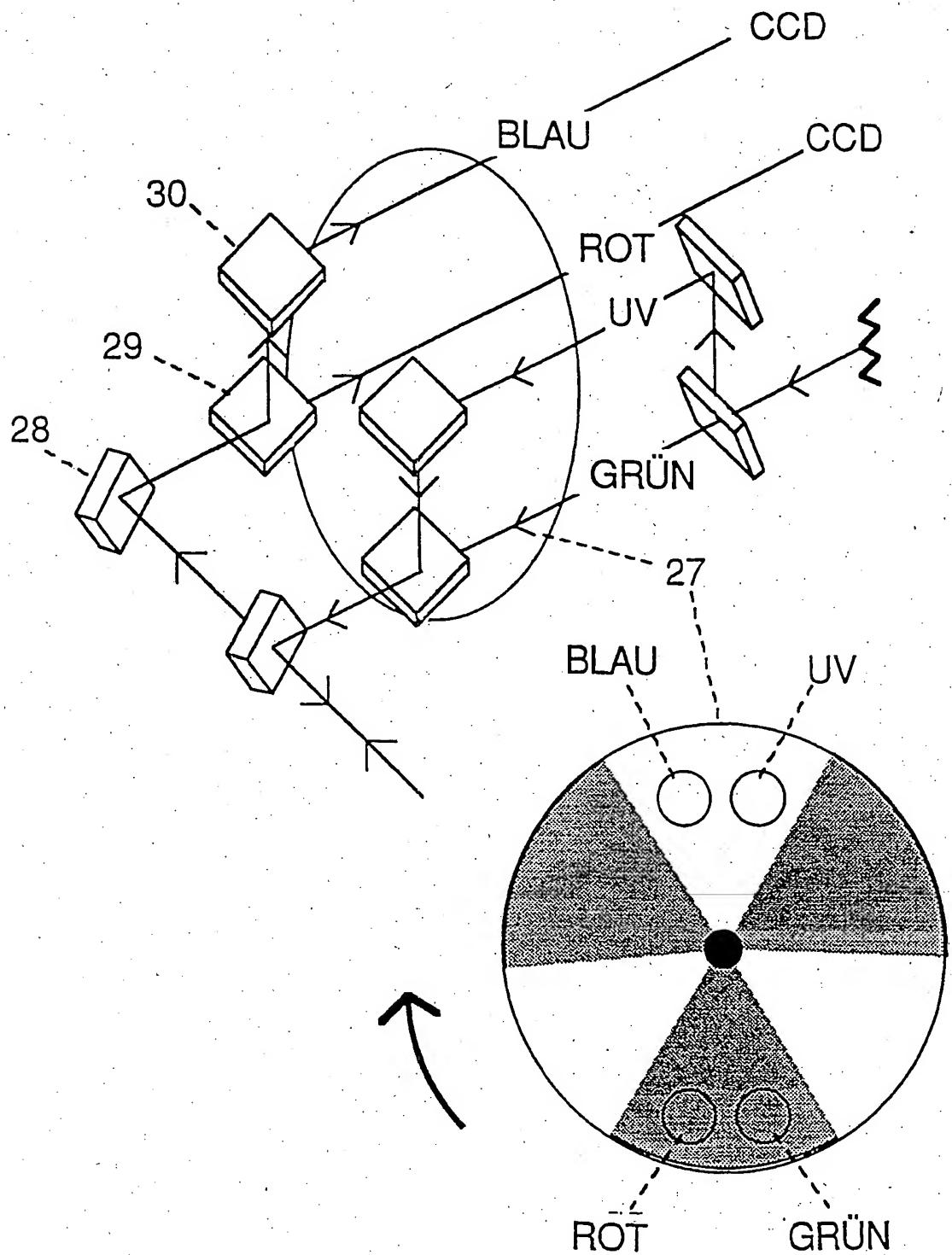


Abb. 3

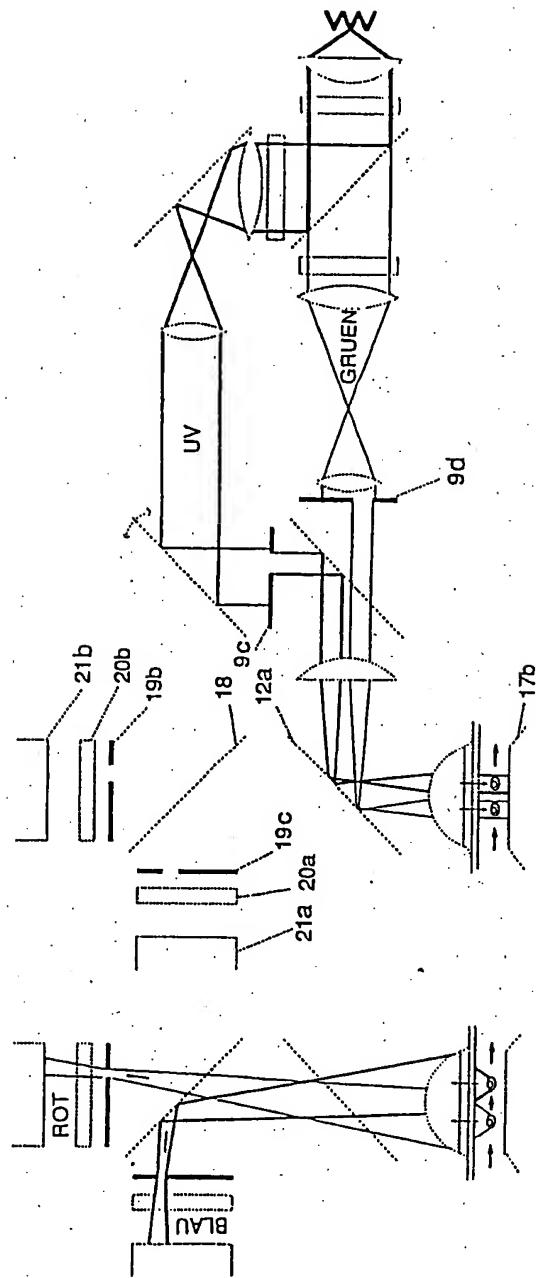


Abb. 4

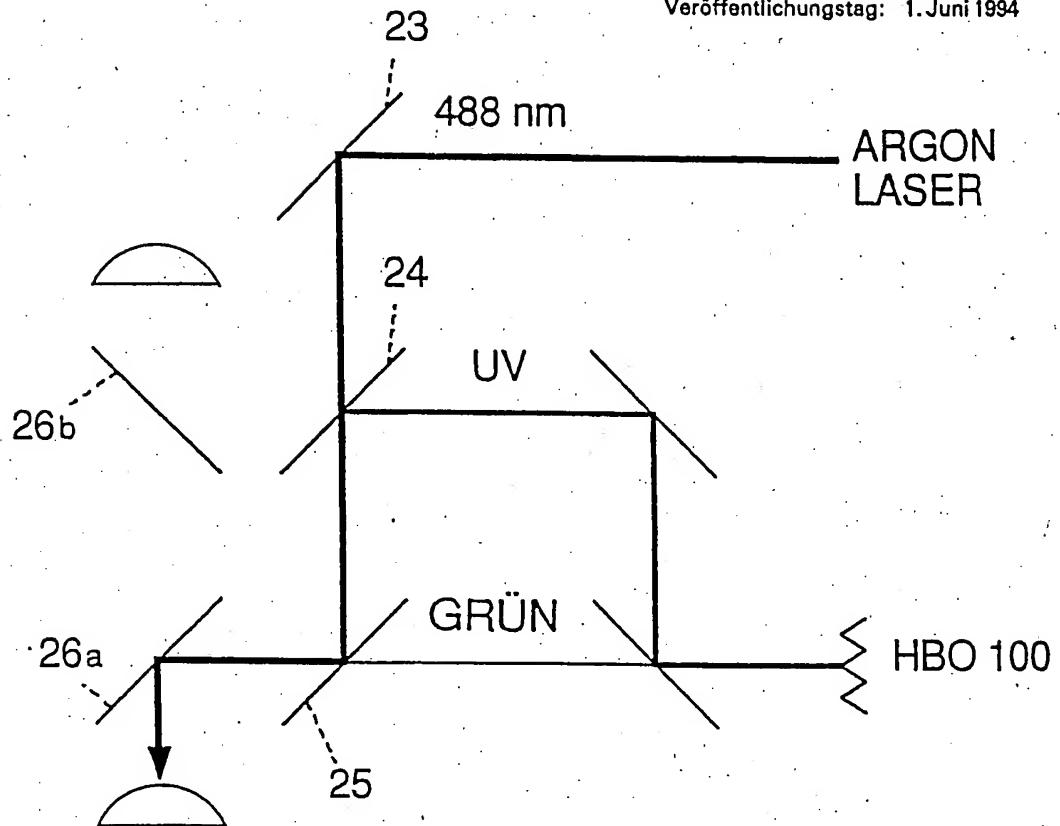


Abb. 5a

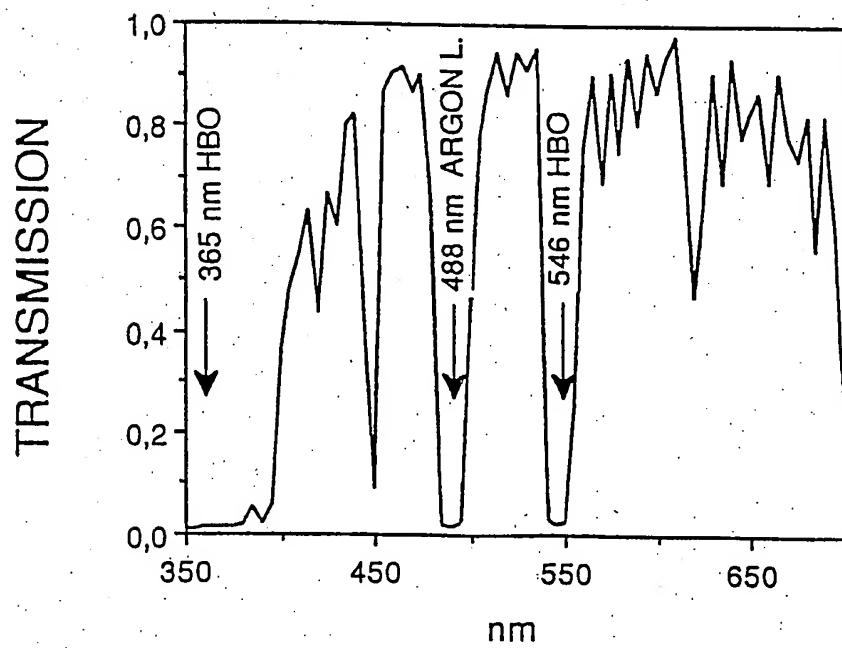


Abb. 5b

CCD

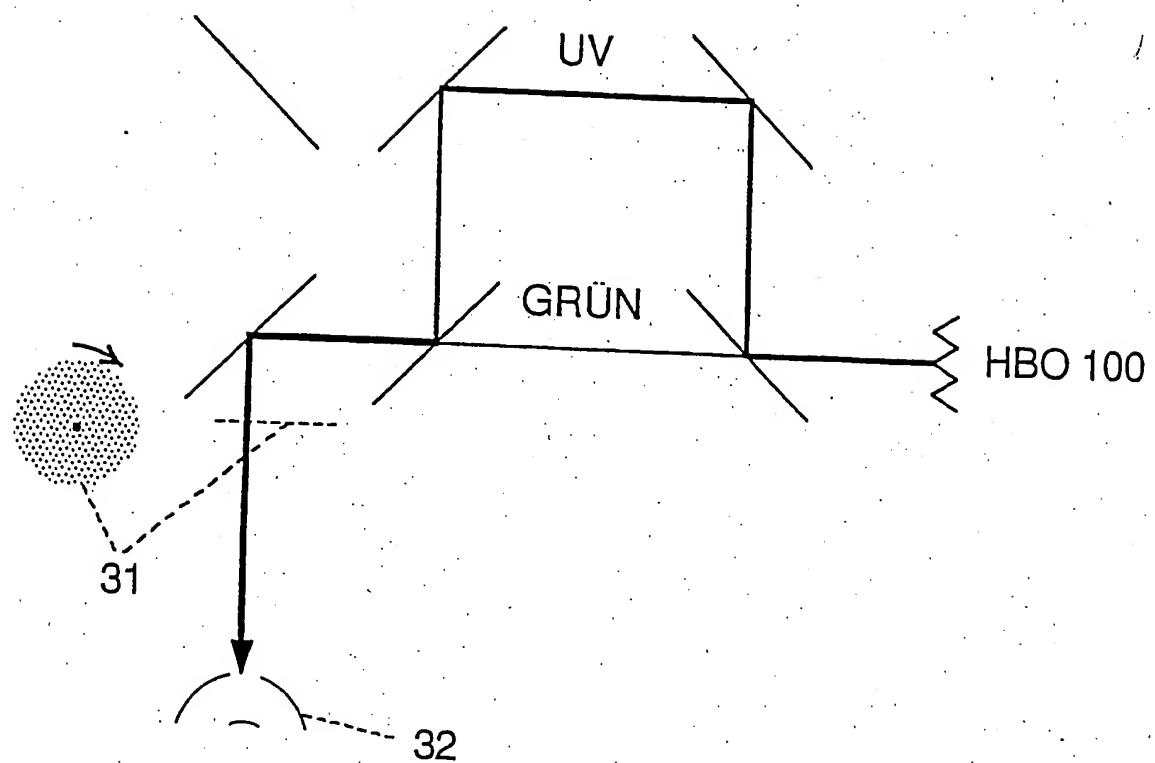


Abb. 6